# Ueber die quantitative Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Harn.

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

K. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sozo Shindo

aus Japan.

---

München 1907.

Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

# Ueber die quantitative Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Harn.

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

K. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sozo Shindo

aus Japan.

---

München 1907.

Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Herr Professor Dr. F. Müller.

Die β-Oxybuttersäure $CH_3 — CH (OH) — CH_2 — COOH$ wurde zuerst von Minkowski und gleichzeitig unabhängig von Külz im Harn von schweren Diabetikern gefunden. Nachdem schon Hallervorden[1]) im diabetischen Harne oft außergewöhnliche Mengen von Ammoniak — bis zu 12,24 g im Tag — gefunden und als Grund dieser gesteigerten Ammoniakausscheidung eine vermehrte Säurebildung vermutet hatte, gelang es Stadelmann[2]) durch Destillation mit Schwefelsäure aus diabetischem Harn α-Crotonsäure $CH_3 — CH = CH — COOH$ zu gewinnen. Minkowski[3]) konnte dann zeigen, daß die Crotonsäure im diabetischen Harn nicht präformiert vorkommt, sondern erst durch Destillation mit Schwefelsäure aus einer andern ursprünglichen Säure entsteht. Es gelang ihm die Säure aus dem Harne rein darzustellen und als β-Oxybuttersäure zu identifizieren. Fast gleichzeitig gelangte Külz[4]) auf einem ganz anderen Wege zur Entdeckung derselben

[1]) Hallervorden: Archiv f. exper. Pathol. und Pharmakol. Bd. 7.
[2]) Stadelmann: Archiv f. exper. Pathol. Bd. 17. S. 419.
[3]) Minkowski: Centralblatt f. d. med. Wissenschaft. S. 242. 1884.
[4]) Kulz: Zeitschrift f. Biologie. Bd. 20. S. 165.

Substanz. Als er im Harne von Diabetikern, die Chloralhydrat erhalten hatten, nach dem Vergären des Zuckers die Gegenwart von Urochloralsäure durch Polarisation konstatieren wollte, fiel ihm auf, daß die Linksdrehung stärker war, als nach der Menge des eingeführten Chloralhydrats erwartet werden konnte. Es stellte sich heraus, daß in dem Harne dieser Kranken neben der Urochloralsäure noch ein zweiter linksdrehender Körper vorhanden war, und zwar auch dann, wenn der Kranke kein Chloral genommen hatte.

Külz konnte den linksdrehenden Körper isolieren; die Analysenzahlen stimmten für die Formel einer β-Oxybuttersäure. Da die Eigenschaften dieser Substanz jedoch zu keiner der damals bekannten Oxybuttersäuren genau stimmten, so bezeichnete sie Külz vorderhand als Pseudo-Oxybuttersäure.

Minkowski[5]) stellte dann fest, daß auch die von ihm entdeckte Säure linksdrehend war und da auch die übrigen Eigenschaften beider Säuren übereinstimmten, so war die Identität beider Substanzen nicht mehr zweifelhaft.

Der Nachweis von β-Oxybuttersäure ist leider nicht in so einfacher Weise zu führen, wie der der Acetessigsäure und des Acetons. Es ist vor allem keine Farbenreaktion bekannt, welche für diese Substanz charakteristisch wäre. Für den Nachweis kommen fol-

[5]) Minkowski: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 13. 18. S. 7.

gende Eigenschaften der β-Oxybuttersäure in Betracht:

I. Sie ist nicht vergärbar.

II. Sie wird durch Bleiacetat und Ammoniak nicht ausgefällt.

III. Sie läßt sich aus dem angesäuerten Harne mit Aether extrahieren.

IV. Sie ist linksdrehend.

V. Bei der Destillation mit starker Schwefelsäure tritt ein Molekül Wasser aus, und sie geht in die Crotonsäure über, die abdestilliert werden kann. Für die Crotonsäure ist ferner ihre Schwerlöslichkeit im Wasser und ihr Schmelzpunkt (72°) charakteristisch, ferner diejenigen Eigenschaften, die ihr als einer ungesättigten Verbindung zukommen (Addition von Brom usw.).

VI. Aus reinen Lösungen kann die Oxybuttersäure unter Umständen in Krystallform erhalten werden (Magnus-Levy[6]).

VII. Kommt für den Nachweis der Oxybuttersäure in Betracht, daß sie sich in der Regel nur in Harnen findet, die reich an Aceton und Acetessigsäure sind.

Külz hat deswegen vorgeschlagen, immer zunächst die Gerhardt'sche Eisenchloridreaktion anzustellen. Fällt diese negativ aus, so sei auch keine Oxybuttersäure vorhanden und weitere Untersuchung zwecklos. Ob dies richtig ist oder nicht doch gelegentlich kleine

---

[6]) Magnus-Levy: Archiv für experim. Path. u. Pharm. Band 45. S. 38.

Mengen von Oxybuttersäure, auch bei Fehlen von Acetessigsäure vorkommen können, bedarf noch weiterer Untersuchung.

Die einfachste Methode der Prüfung von Oxybuttersäure nach Külz[7]) ist die, daß man den Harn — aus zuckerhaltigem Harn muß erst der Zucker durch Gärung vollständig entfernt werden — mit Bleiacetat und Ammoniak ausfällt und das Filtrat im Polarisationsapparate untersucht. Dreht es links, so ist die Gegenwart der β-Oxybuttersäure sehr wahrscheinlich.

Doch ist diese Probe einerseits nicht ganz sicher, anderseits ist sie wegen Verdünnung der Lösung nicht empfindlich.

Zum sicheren Nachweis wird der Harn oder sein Alkoholextrakt (Minkowski) angesäuert und mit Aether extrahiert. Das ätherische Extrakt wird auf sein Drehungsvermögen untersucht und event. zur Darstellung des Silbersalzes verwendet.

Die zweite sichere Methode ist von Külz: Der Harn (zuckerhaltiger nach dem Vergären) wird zum Syrup eingedampft und der Rückstand nach dem Zusatz des gleichen Volumens konzentrierter Schwefelsäure der Destillation unterworfen (ohne Kühlung). Bei der Gegenwart von β-Oxybuttersäure enthält das Destillat Crotonsäure; man extrahiert das Destillat mit Aether; beim Verdunsten des Aethers bleibt Crotonsäure zurück und

[7]) Kulz: a. a. O.

kann durch den Schmelzpunkt identifiziert werden.

Statt mit Harn selbst kann man diese Destillation mit Schwefelsäure natürlich auch mit dem ätherischen Extrakt des Harnes ausführen.

Die quantitative Bestimmung der β-Buttersäure bietet natürlich noch größere Schwierigkeit als der qualitative Nachweis. Es geht nicht an, aus der Linksdrehung des vergorenen, eventuell noch mit Bleiacetat und Ammoniak ausgefällten Harnes den Gehalt an Oxybuttersäure zu berechnen. Schon deshalb nicht, weil in dieser Lösung die Linksdrehung so gering zu sein pflegt, daß die unvermeidlichen Ablesungsfehler zu sehr ins Gewicht fallen; ferner wird durch das überschüssige Blei die Drehung der Oxybuttersäure in hohem Grade beeinflußt (Magnus-Levy[8]).

Man hat vielfach auf eine direkte Bestimmung der β-Oxybuttersäure verzichtet und auf indirektem Wege Anhaltspunkte für ihre Menge zu gewinnen versucht. So hat sich speziell für den klinischen Gebrauch die Bestimmung der Ammoniakmenge als Maßstab für die Schätzung der β-Oxybuttersäure eingebürgert.

Diese Verwertung der Ammoniakbestimmung beruht bekanntlich darauf, daß der Organismus des Menschen, wie auch der des Hun-

[8]) Magnus-Levy: Archiv für experim. Path. u. Pharm. Band 45. S. 389.

des zugeführte oder im Körper entstandene nicht verbrennbare Säuren in Form ihrer Ammoniaksalze durch den Harn ausscheidet (Walter); infolgedessen steigt die Ammoniakmenge, die normalerweise etwa 0,5 g pro Tag beträgt, jedenfalls 1,0 g nicht wesentlich überschreitet; eine solche Steigerung der Ammoniakausscheidung zeigt an, daß mit dem Harne abnorme Mengen von Säuren ausgeschieden werden.

Die Berechnung ergibt, daß eine Mehrausscheidung von 1,0 g Ammoniak einer Menge von etwa 6 g Oxybuttersäure entspricht. Freilich kann so nur eine ganz beiläufige Schätzung gemacht werden, denn einerseits wird die Ammoniakvermehrung nicht nur durch Oxybuttersäureausscheidung hervorgerufen, sondern ist überhaupt ein Zeichen der Vermehrung der Säuren im Harn, es wird bei schweren Diabetikern z. B. auch die Menge der Acetessigsäure und etwa vorhandener Milchsäure auf die Größe der Ammoniakausscheidung von Einfluß sein, anderseits nehmen an der Neutralisation der Säure neben dem Ammoniak auch die Alkalien und Erdalkalien teil, vor allem dann, wenn sie, wie das bei diesen Kranken aus therapeutischen Gründen häufig geschieht, in großen Mengen in den Organismus eingeführt werden, dann kann sogar trotz Gegenwart großer Mengen von β-Oxybuttersäure die Steigerung der Ammoniakausscheidung vollständig fehlen; in diesen Fällen ist natürlich die Bestimmung der Ammoniakausscheidung für

die Beurteilung der im Harne enthaltenen Menge von Oxybuttersäure wertlos.

Eine zweite, ebenfalls indirekte, aber exaktere Methode ist die, welche Magnus-Levy[9]) zum Studium der diabetischen Acidose eingeschlagen hat.

Magnus-Levy bestimmte in derselben Weise wie früher schon Stadelmann die Menge sämtlicher Basen und sämtlicher im normalen Harne vorkommenden Säuren; bei Anwesenheit abnormer Säuren ergibt sich bei Berechnung der Gesamtmenge der Basen und der Gesamtmenge der bestimmten Säuren ein Ueberschuß zu Gunsten der Basen. Dieser Ueberschuß entspricht eben der Menge der krankhafterweise ausgeschiedenen abnormen Säuren.

Allerdings ist damit keineswegs nur die Menge der Oxybuttersäure bestimmt, sondern die Menge der abnormen Säure überhaupt.

Magnus-Levy hat auf diesen Punkt selbst scharf hingewiesen; aber abgesehen davon, daß diese Methode demnach gar keine Methode zur Bestimmung von β-Oxybuttersäure vorstellt, ist ihre Ausführung so zeitraubend und mühselig, daß sie höchstens in einzelnen Fällen praktisch verwendet werden kann.

Die Methoden zur direkten Bestimmung der β-Oxybuttersäure zerfallen ebenso wie die Methoden des qualitativen Nachweises in zwei Gruppen.

---

[9]) Magnus-Levy: Archiv für experim. Path. u. Pharm. Band 45. S. 389.

Bei den Methoden der ersten Gruppe dient die Polarisation der aus dem Harne extrahierten β-Oxybuttersäure zur quantitativen Bestimmung; die spezifische Drehung der β-Oxybuttersäure, die früher meist zu niedrig angenommen wurde, beträgt nach Magnus-Levy 24,12°.

Der zweite Weg ist der, die β-Oxybuttersäure durch starke Schwefelsäure in Crotonsäure überzuführen und diese zu bestimmen. Dieser Weg ist nur von Darmstädter beschrieben worden.

## I. Die palarimetrischen Methoden.

### 1. Methode von Wolpe.

Wolpe[10]) war der erste, der eine quantitative Schätzung der β-Oxybuttersäure versuchte. Er ging folgenderweise vor:

Von dem unter Zusatz von reiner Carbolsäure gesammelten Harn werden 500—1000 $cm^3$ bei mäßiger Wärme zum Syrup eingedampft und mit Alkohol extrahiert.

Der alkaholische Auszug wird abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Aether so lange ausgeschüttelt, als eine abgegossene Aetherprobe beim Verdunsten einen nennenswerten Rückstand läßt. Gewöhnlich genügt dazu eine etwa 15malige Erneuerung des Aethers.

[10]) Wolpe: Archiv f. exp. Path. Bd. 21. S. 138.

Nach dem Ausschütteln wird jedesmal der Aether in einen kleinen Kolben gegossen, in demselben mit wenig Wasser wieder geschüttelt und dann abgegossen. Der zu jeder folgenden Ausschüttelung benutzte Aether wird wieder mit demselben Wasser gewaschen. Es gelingt auf diese Weise erhebliche Verluste zu vermeiden. Der nun von den letzten Spuren von Schwefelsäure und Zucker befreite Aether wird bei mäßiger Hitze verdunstet.

Der hinterbleibende, leicht bräunlich gefärbte Syrup wird etwas verdünnt mit Bleiessig versetzt, filtriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, abermals filtriert und auf ein bestimmtes Volum (25—30 $cm^3$) gebracht. In der erhaltenen Lösung, die in der Regel schwach gelb gefärbt ist, wird die Linksdrehung am Soleil.-Ventzke'schen Saccharimeter bestimmt.

Diese Methode ist, wie Magnus-Levy angibt, sehr zeitraubend und niemals quantitativ.

Auch die Versuche von Magnus-Levy, diese Methode zu modifizieren, führten zu keinem befriedigenden Resultat.

2. Methode von Magnus-Levy.[11])

Magnus-Levy hat später folgende Methode zur direkten Bestimmung benutzt:

300—400 $cm^3$ Urin (bei geringem Gehalt an Oxybuttersäure mehr) werden unvergoren

[11]) Magnus-Levy: Archiv f. Path. Bd. 42. S. 68.

unter Zusatz von ca. 15—20 g Ammoniaksulfat auf ca. 60—80 cm³ eingedampft, ein alignoter Teil des Filtrats, entsprechend 250 cm³ Urin, mit ca. 20 cm³ einer verdünnten, mit Ammoniaksulfat gesättigten Schwefelsäure versetzt. Die so erhaltene saure Flüssigkeit, deren Menge 70—100 cm³ beträgt, wird mit je 400 cm³ Aether im Schüttelapparat 18mal je 15 Minuten ausgeschüttelt; verwendet man für jede Extraction 900 cm³ Aether, so genügt 20malige Wiederholung. Jede einzelne abgehobene Aetherfraction wird mit einer stets wieder verwendeten kleinen Wassermenge sorgsam gewaschen. Das vom Waschwasser getrennte ätherische Extrakt wird 24 Stunden stehen gelassen, dann der Aether abdestilliert.

Der zurückbleibende Syrup wird mit einer bestimmten Menge Wasser aufgenommen; dann wird von der in Form öliger Tröpfchen sich abscheidenden Hippursäure abfiltriert und im Filtrat die β-Oxybuttersäure polarimetrisch bestimmt.

Diese Methode ist weniger zeitraubend als die Wolpe'sche. Sie hat ferner den Vorteil, daß das Vergären des Zuckers wegfällt und daß infolge der Gegenwart des Ammonsulfat die Emulsionsbildung beim Schütteln vermieden wird.

3. Methode von Bergell.[12])

Bergell hat durch Anwendung von Trokkenmitteln den Harnrückstand zu einem

[12]) Bergell: Zeitschrift f. Physio. Chemie. 33. S. 311.

trockenen Pulver verwandelt und dieses im Soxhlet'schen Apparat mit Aether extrahiert. Er beschreibt seine Methode folgendermaßen:

100—300 cm³ Harn werden bei schwach alkalischer Reaktion mit Natriumcarbonat auf dem Wasserbade zum Syrup eingedampft. Der Rückstand wird nach dem Erkalten zunächst mit einem Phosphorsäuresyrup unter Kühlung dann 20—30 g fein gepulverten, geglühten Kupfersulfat und 20– 25 g sehr feinkörnigen Sandes verrieben, wodurch ein trokkenes Pulver erhalten wird.

Die so getrocknete Substanz wird quantitativ auf ein Soxhletfilter gebracht und mit gleichfalls durch Kupfersulfat vollständig getrocknetem Aether im Extractionsapparat vollständig erschöpft, was bereits nach einer Stunde erreicht ist. Das Kupfersulfat mit trockenem Aether ausgewaschen, der Aether abdestilliert, der Rückstand mit 20 cm³ Wasser aufgenommen, mit sehr wenig Tierkohle entfärbt und die Linksdrehung bestimmt.

Zuckerhaltige Harne sollen, wie aus der Publikation von Bergell hervorzugehen scheint, zunächst vergoren werden.

Diese Methode Bergell's bereitet jedoch bei der praktischen Ausführung gewisse Schwierigkeiten; es ist vor allem nicht leicht, den Harn mit Sand und Kupfersulfat zu einem ganz trockenen, feinkörnigen Pulver zu verreiben, was eine unbedingte Voraussetzung für eine quantitative Extraction ist. Dagegen hat die Praxis im Laboratorium der II. medizin.

Klinik ergeben, daß diese Forderung beim Verwenden von Kieselguhr leicht zu erfüllen ist; ferner hat sich ergeben, daß eine quantitative Extraction kaum jemals innerhalb einer Stunde zu erreichen ist; sie benötigt in der Regel 1—2 Tage. Man geht demnach bei der Ausführung der Bergell'schen Methode folgendermaßen vor:

100—300 $cm^3$ Harn (zuckerhaltiger nach dem Vergären) werden mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade in einer Porzellanschale zum Syrup eingedampft (nicht zu weit, weil sonst der Rückstand zu fest an der Schale haftet).

Der Rückstand wird nach dem Erkalten unter Kühlung mit Phosphorsäuresyrup oder mit krystallisierter Phosphorsäure versetzt, in der Porzellanschale mittels eines Pistills gleichmäßig verrührt, so lange bis ein gleichmäßiger, nirgends mehr fest an der Porzellanschale haftender Syrup resultiert; dann wird Kieselguhr portionsweise eingetragen, immer wieder mit dem Pistill gleichmäßig verrührt und mit dem Zusatz von Kieselguhr solange fortgefahren, bis man ein ganz gleichmäßiges, feines, trockenes Pulver erhalten hat. Dies Pulver wird quantitativ in eine Soxhlethülse (Schleicher und Schüll) gebracht (die letzten Reste werden am besten mit einigen Stückchen Filtrierpapier ausgewischt) und zwei Tage (nachts unterbrochen) mit trockenem Aether extrahiert; dann wird der Aether aus dem ätherischen Extrakt abdestil-

liert. Der Rückstand wird mit 20 cm³ Wasser aufgenommen, mit Tierkohle geschüttelt, filtriert und im Filtrat die Linksdrehung bestimmt. 1 Grad Linksdrehung im 1 d. m. Rohr entspricht einem Oxybuttersäuregehalt von 1,15% in der polarisierten Lösung; daraus wird der Gehalt des Harnes berechnet.

Wenn es durch Tierkohlezusatz nicht gelingt, die Polarisationslösung genügend zu entfärben, so erreicht man dies meist durch Zusatz von Bleicarbonat oder Bleiacetat; nur ist es dann notwendig, im Filtrat das überschüssige Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff als Schwefelblei auszufällen und aus dem Filtrat den Schwefelwasserstoff durch Durchblasen von Luft zu vertreiben. Um sicher zu sein, daß durch die Extraction die gesamte Oxybuttersäure extrahiert worden ist, ist es zweckmäßig, das bereits extrahierte Pulver nochmals einen Tag mit frischem Aether zu extrahieren. Das ätherische Extract, in der angegebenen Weise behandelt, soll keine Linksdrehung mehr geben; ist das dennoch der Fall, so muß der erhaltene Wert zu dem des ersten Extracts hinzuaddiert und mit der Extraction bis zur völligen Erschöpfung fortgefahren werden.

In der beschriebenen Weise ausgeführt, gibt die Bergell'sche Methode nach unserer Erfahrung bei Parallelbestimmungen gut übereinstimmende Werte; so habe ich zur Kontrolle zu 500 cm³ normalen Harnes 1,275 g aktive β-Oxybuttersäure (ätherisches Extract

aus diabetischem Harn polarimethodisch bestimmt) zugesetzt und in 150 cm³ die β-Oxybuttersäure bestimmt. Ich fand 0,382 g wieder, auf die ursprünglich 150 cm³ berechnet, ergibt das einen Gehalt von 1,270 g. Der Fehler beträgt demnach nicht einmal 1%.

Ein Nachteil der Methode ist, daß die Resultate erst nach mehreren Tagen gewonnen werden.

### II. Methode von Darmstädter[13]).

(Ueberführung in Crotonsäure.)

Um die Mängel der polarimetrischen Methode (langdauernde Aetherextraction, Möglichkeit, daß auch andere drehende ätherlösliche Substanzen zugegen sind) zu vermeiden, hat Darmstädter den Versuch unternommen, die Ueberführung in Crotonsäure zu einer quantitativen Methode auszuarbeiten.

Er fand zunächst, daß unter bestimmten Bedingungen diese Umwandlung von β-Oxybuttersäure in Crotonsäure quantitativ verläuft. Die abdestillierte Crotonsäure bestimmt er durch Titration mit $\frac{N}{10}$ Natronlauge, nachdem vorher die flüchtige Fettsäure durch Erhitzen auf 160° vertrieben war. Im einzelnen gestaltet sich seine Methode wie folgt:

100 cm³ des zu untersuchenden Harnes werden mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade bis

[13]) Darmstädter: Berliner phisiol. Chemie Bd. 37. S. 355.

fast zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 150—200 $cm^3$ Schwefelsäure von 50—55% Gehalt an $H_2SO_4$ in einem Kolben gespült. Man erhitzt nun anfangs vorsichtig mit kleiner Flamme, dann kräftig und läßt in dem Maße Wasser zutropfen, als dieses abdestilliert. Man erhitzt solange, bis etwa 300—350 $cm^3$ Flüssigkeit übergegangen sind, was in 2—$2^1/_2$ Stunden geschehen ist.

Das Destillat wird 2—3 mal mit Aether ausgeschüttelt und der Aether abdestilliert. Man erhitzt nun einige Minuten auf dem Sandbade auf 160°, um etwa vorhandene Fettsäure abzutreiben, löst nach dem Erkalten in 50 $cm^3$ Wasser auf, filtriert die ungelöste Substanz ab und wäscht mit etwas Wasser nach. Man titriert nun die wässerige Lösung der Crotonsäure mit $\frac{N}{10}$ Natronlauge mit Phenolphtalein als Indicator.

100 $cm^3$ $\frac{N}{10}$ NaOH entsprechen den 0,86 g Crotonsäure, die mit 1,21 multipliziert = β-Oxybuttersäure. Mittels dieser Methode fand Darmstädter von käuflicher (inaktiver) β-Oxybuttersäure, die zu normalem oder zuckerhaltigem Harne zugesetzt, 99,36 bis 99,64% wider.

Bei der Nachprüfung dieser Methode, bei der genau nach den Vorschriften Darmstädters verfahren wurde, gelangte ich nicht zu günstigen Resultaten; so fand ich nach Zusatz von 1.275 g aktiver β-Oxybuttersäure zu 500 $cm^3$ normalen Harn in 150 $cm^3$

0,2123 g wieder, auf 500 cm³ gerechnet, 0,7008 g.

Der Fehler beträgt 44,8%, während die Bestimmung nach der Bergell'schen Methode nicht einmal 1% Fehler ergeben hatte.

Es war nur zu ermitteln, bei welcher Prozedur dieser erhebliche Verlust eingetreten war.

Ich untersuchte zunächst, ob die Ueberführung der β-Oxybuttersäure in Crotonsäure unter den von Darmstädter angegebenen Bedingungen quantitativ verläuft. Nach meinen Versuchen ist das tatsächlich der Fall.

Versuchsreihe A.

a) Zu 150 cm³ 50%iger Schwefelsäure wurde 0,0228 inaktive β-Oxybuttersäure zugesetzt und in einem Kolben unter fortwährendem Zusatz von Wasser destilliert; im Destillat (400 cm³) wurde durch Titration mit $\frac{N}{10}$ NaOH (Phenolphtalein als Indicator) Crotonsäure entsprechend einer Menge von 0,0223 g β-Oxybuttersäure gefunden.

Der Fehler beträgt 1,3%.

b) Auf dieselbe Weise wurden von 0,0873 g β-Oxybuttersäure 0,0868 g wiedergefunden.

Der Fehler beträgt 0,6%.

c) Von 0,031 g β-Oxybuttersäure 0,031 g wiedergefunden.

Fehler 0.

Es war nun daran zu denken, daß der Verlust an Crotonsäure bei dem Ausschütteln mit

Aether oder bei dem Erhitzen auf dem Sandbade eingetreten war.

Ich habe deshalb zu 300 cm³ Wasser 0,062 g Crotonsäure zugesetzt mit je 300 cm³ Aether 3 mal ausgeschüttelt, dann auf dem Sandbade 3 Minuten lang erhitzt. Der Rückstand wurde mit $\frac{N}{10}$ Natronlauge titriert und nur 0,0365 g wiedergefunden, das ist 60% der ursprünglichen Menge; es war also ein großer Teil verloren gegangen. Daß die Ausschüttelung mit Aether so unvollständig war, schien bei der guten Löslichkeit der Crotonsäure in Aether und ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser von vornherein unwahrscheinlich, dagegen konnte das Erhitzen auf dem Sandbade den Verlust bedingt haben. Diese Annahme lag umso näher als die Crotonsäure, wie schon ihre Eigenschaften (Geruch und Destillierbarkeit) zeigen, eine flüchtige Säure ist.

Zur Entscheidung habe ich 0,131 g krystallisierte Crotonsäure in einem Wägegläschen 3 Minuten lang auf 160° erhitzt, nach dem Erkalten gewogen, dann wieder erhitzt usw. Das Resultat war folgendes:

| | Gewicht | Verlust |
|---|---|---|
| ursprünglich | 0,1310 g | |
| nach dem 1. Erhitzen | 0,0705 g | 0,0605 g |
| „ „ 2. „ | 0,0175 g | 0,0530 g |
| „ „ 3. „ | 0,0055 g | 0,0120 g |
| „ „ 4. „ | 0,0015 g | 0,0040 g |
| „ „ 5. „ | 0,0000 g | 0,0015 g |

Es war damit festgestellt, daß die Crotonsäure bei dem von Darmstädter verwende-

ten Erhitzen auf 160° durch 3 Minuten sich verflüchtigt, so daß nach 5maligem Wiederholen von 0,131 g Säure gar nichts übrig bleibt.

Damit ist klargestellt, warum die Darmstädter'sche Methode unrichtige, zu niedrige Werte liefert. Ich versuchte nun, diesen Fehler der Methode zu vermeiden. Wenn es möglich war, in Destillate die Crotonsäure statt durch Alkalimetrie nach einer Methode zu bestimmen, bei der die übrigen Fettsäuren nicht stören, so war dieses Erhitzen auf dem Sandbade, das zum Verluste an Crotonsäure führen muß, überflüssig und konnte weggelassen werden.

Eine solche Methode ergab sich aus der der Crotonsäure als einer ungesättigten Verbindung zukommenden Fähigkeit, Brom zu addieren; sie geht dabei in Dibrombuttersäure über:

$$CH_3 — CH = CH — COOH + 2\,Br$$
$$= CH_3 — CHBr — CHBr — COOH$$

Ich überzeugte mich zunächst, daß diese Methode bei reiner Crotonsäure richtige Werte liefert. 0,0639 g Crotonsäure wurden mit 20 cm³ Bromwassers (entsprechend 23,1 cm³ $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfat[14])) versetzt und 10 Minuten lang stehen gelassen (die Flüssigkeit

[14]) Dieser Wert wurde in der Weise bestimmt, dass ein Ueberschuss von Jodkalium zugesetzt und das frei gewordene Jod mittels $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfat titriert wurde. (Stärkekleister als Indicator.)

war noch gelb zum Zeichen, daß das Brom in Ueberschuß vorhanden war).

Darauf wurde Jodkalium in Ueberschuß zugesetzt und in der braun gewordenen Flüssigkeit das Jod mit $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfat zuletzt unter Verwendung von Stärkekleister als Indicator titriert.

| | $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfatlösung |
|---|---|
| Zugesetzte Brommenge entspricht | 23,1 cm³ |
| Zurücktitrierte Brommenge „ | 8,3 cm³ |
| Verbrauchte Brommenge entspricht | 14,8 cm³ |

Da nun 1 Molecul Crotonsäure 2 Atom Brom addiert, also 86 g Crotonsäure so viel Brom als 2 l $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfatlösung entspricht, so zeigt 1 cm³ von verbrauchter Natriumthiosulfatlösung $\frac{86}{2000}$ = 0,0043 g Crotonsäure (0,0052 g β-Oxybuttersäure) an. Daraus berechnet sich in vorliegendem Falle 0,06364 g Crotonsäure.

Fehler 0,47%.

Um weiter zu untersuchen, ob bei der Destillation mit starker Schwefelsäure keine störenden Substanzen ins Destillat übergehen, habe ich 200cm³ normalen Harns mit 78 cm³ conc. Schwefelsäure destilliert. Das Destillat verbrauchte Bromwasser entsprechend 4,1 cm³ $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfatlösung.

Es gehen also tatsächlich aus normalem Harn bei der Destillation brombindende Stoffe über, offenbar Phenole. Um den Fehler, wel-

cher durch die Anwesenheit der Phenole im Destillat verursacht wird, auszuscheiden, habe ich das Destillat mit Barium-Carbonat auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, um die Phenole zu verjagen; der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert, das Filter mit Wasser nachgewaschen, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert, dann mit Bromwasser und Natriumthiosulfat titriert.

150 cm³ desselben Normalharnes wurde in dieser Weise behandelt, 0,0616 g Brom vorgelegt und 14,3 cm³ $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfatlösung = 0,0615 g Brom zurücktitriert. Also beträgt die Differenz nur 0,2%.

Es gelingt also auf die angegebene Weise den störenden Einfluß der Phenole zu vermeiden. Gegenwart von Ameisensäure, salpetriger Säure im Harn wird, da diese Substanzen ebenfalls ins Destillat übergehen und Halogen binden, zu Fehlern Veranlassung geben, doch ist die Menge dieser Substanzen im Harn meist so gering, daß der Fehler vernachlässigt werden darf.

Versuchsreihe B.

| | | |
|---|---|---|
| Zu 350 cm³ Harndestillat | | |
| hinzugesetzt | 0,119 g | Crotonsäure |
| wiedergefunden | 0,118 g | „ |
| Fehler | 0,001 g | oder 0,9% |
| Zu 350 cm³ Harndestillat | | |
| hinzugesetzt | 0,0880 g | Crotonsäure |
| wiedergefunden | 0,0875 g | „ |
| Fehler | 0,0005 g | oder 0,7% |

| | | |
|---|---|---|
| Zu 355 cm³ Harndestillat | | |
| hinzugesetzt | 0,174 g | Crotonsäure |
| wiedergefunden | 0,172 g | „ |
| Fehler | 0,002 g | oder 1,1% |
| Zu 400 cm³ Harndestillat | | |
| hinzugesetzt | 0,132 g | Crotonsäure |
| wiedergefunden | 0,132 g | „ |
| Fehler | 0 | |

Da nach den von mir bestätigten Resultaten Darmstädters die Ueberführung der β-Oxybuttersäure in Crotonsäure quantitativ verläuft, so war zu erwarten, daß durch Kombination der beiden Verfahren die Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Harne möglich sein würde.

Zur Prüfung habe ich auf diese Weise den bereits mehrfach erwähnten, mit β-Oxybuttersäure versetzten Harn, der in 500 cm³ 1,275 g β-Oxybuttersäure enthielt, untersucht und in 150 cm³ 0,3126 g Crotonsäure resp. 0,37826 g β-Oxybuttersäure wiedergefunden.

Der Verlust beträgt also 1,1% (Verlust bei der Bergell'sche Methode (siehe oben) 0,6%, nach ursprünglicher Darmstädter'scher (siehe oben) 44,8%; das Resultat war also sehr befriedigend.

Noch war die Frage zu beantworten, ob es notwendig ist, bei Verwendung dieser Methode etwa vorhandenen Zucker zu vergären.

Ich habe deshalb zu 250 cm³ Harn 5,0 g Traubenzucker und 0,5455 g β-Oxybuttersäure

zugesetzt und in 55 cm³ die β-Oxybuttersäure direkt, in einer anderen Portion (55 cm³) nach der Vergärung des Zuckers die β-Oxybuttersäure bestimmt. In der nicht vergorenen Portion fand ich 0,119 g β-Oxybuttersäure, auf 250 cm³ berechnet 0,539 g wieder; in der vergorenen 0,117 g, das ist in der gesamten Menge 0,533 g.

Dies Resultat zeigt, daß das Vergären des Harnes nicht nötig ist.

Ich habe noch an dem Harn eines schweren Diabetikers die Resultate dieser Methode mit denen der Bergell'schen verglichen und gut übereinstimmende Werte erhalten.

Versuchsreihe C.

Harn a. 200 cm³ diabetischen Harnes, nach der oben beschriebenen Bergell'schen Methode untersucht, ergeben 0,551% β-Oxybuttersäure, nach der angegebenen Modifikation der Darmstädter'schen Methode 0,591%. Differenz 6,8%.

Harn b desselben Patienten. Nach Bergell 0,560%, nach der modifizierten Darmstädter'schen Methode 0,546%. Differenz 2,3%.

Harn c. Nach Bergell 0,414%, nach der modifizierten Darmstädter'schen Methode 0,427%. Differenz 3,1%.

Zum Schlusse beschreibe ich nochmals genau das Vorgehen bei der modifizierten Darmstädter'schen Methode.

Es werden 150—200 $cm^3$ des Harnes mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade bis fast zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 150 bis 200 $cm^3$ von 50—55 gewichtsprozentiger Schwefelsäure in einem Kolben abdestilliert, bis 400 $cm^3$ Flüssigkeit ins Destillat übergegangen sind. Man destilliert ganz vorsichtig mit kleiner Flamme ab, damit kein Schaum ins Destillat übergeht, und läßt ebensoviel Wasser zutropfen, als abdestilliert.

Das Destillat wird mit Barium-Carbonat (ca. 3—4 g) neutralisiert und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade eingedampft.

Den Rückstand nimmt man mit Wasser auf; dann wird filtriert, noch mehreremale mit Wasser nachgewaschen.

Das Filtrat wird mit Salzsäure angesäuert, dann eine abgegossene Menge von Bromwasser, dessen Titer mittelst Jodkalium und $\frac{N}{10}$ Thiosulfatlösung gestellt wurde (siehe oben), versetzt; man läßt 10 Minuten lang stehen; dabei muß die Flüssigkeit gelb bleiben; wenn das nicht der Fall ist, so fügt man nochmal Bromwasser zu. Man setzt darauf Jodkalium im Ueberschuß zu. In der braun gewordenen Flüssigkeit titriert man Jod zurück mit $\frac{N}{10}$ Natriumthiosulfat, Stärkekleister als Indicator (Rechnungsweise siehe oben). In β-oxybuttersäurereichen, phenolarmen Harnen kann man das Verfahren auch abkürzen, indem man die Titration mit Brom direkt ins Destillat

vornimmt, ohne vorher mit Bariumcarbonat abzudampfen.

---

Zum Schlusse erübrigt mir nur noch, Herrn Professor Dr. F. Müller für die Zuwendung des Themas und für die gütige Unterstützung während der Ausführung, sowie Herrn Dr. Neubauer für die mannigfaltigsten Anregungen meinen besten Dank auszusprechen.

---

## Lebenslauf.

Verfasser, Sozo Shindo, ist geboren am 25. Januar 1879 zu Nakagun, Kreis Kanagawaken, in Japan als Sohn des verstorbenen Gutsbesitzers Asakichi Shindo. Nach Absolvierung des Gymnasiums zu Tokyo besuchte er die medizinische Akademie zu Tokyo. Nach deren Absolvierung ward ihm die Approbation als praktischer Arzt erteilt. Ferner fungierte er 6 Jahre lang als erster Assistent von Professor Nakahama und besuchte gleichzeitig die medizinische Abteilung der Universität. Darauf begab er sich November 1905 nach München, um an der hiesigen Universität sein Studium zu vervollkommnen.